



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/749,703 #2

10/642703

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年12月27日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第371333号

出願人

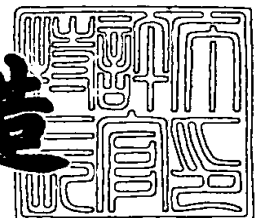
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2000年 9月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3077988

【書類名】 特許願

【整理番号】 863185

【提出日】 平成11年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 固相担体表面へのDNA断片の固定方法及びDNAチップ

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 佐藤 忠久

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 中村 剛希

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 篠木 浩

【特許出願人】

 【識別番号】 000005201

 【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100074675

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 柳川 泰男

 【電話番号】 03-3358-1798

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 055435

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固相担体表面へのDNA断片の固定方法及びDNAチップ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面に0価遷移金属薄膜が形成された固相担体の表面に、アルキン基を末端部に有するDNA断片を液相にて接触させ、該DNA断片をアルキン基末端部にて0価遷移金属薄膜に結合させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項2】 0価遷移金属が、銀または銅であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項3】 請求項1もしくは2に記載の方法により得られたDNAチップ。

【請求項4】 請求項3に記載のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【請求項5】 請求項3に記載のDNAチップの表面に、蛍光発生基もしくは導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料とを含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光もしくは導電性基を介して流れる電流を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数

のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。本発明はまた、そのDNA断片の固相担体表面への固定方法により製造されたDNAチップ、そしてDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】

多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでおり、その解析手段として、DNAチップが利用されている。DNAチップは通常、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA断片を整列固定させたマイクロアレイの形態にあり、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を持つDNA断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定し、検出する方法に利用される。形成されたハイブリッドの検出手段としては、DNA断片試料に予め結合させた蛍光標識あるいは放射性標識を利用する方法、そしてハイブリッドに取り込まれる蛍光発生基もしくは導電性基を持つインターカレータを利用する方法などが知られている。

【0003】

DNAチップを用いるDNAチップ技術は、DNA以外の生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発、エネルギーや環境問題対策等の研究開発に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0004】

DNAの解析手段としてのDNAチップの利用が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法（SBH, sequencing by hybridization）が考案されたことに始まる（Drmanac, R. et al., Genomics, 4, page 114 (1989)）。SBHは、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、実用化には至らなかった。

【0005】

その後、DNAチップ作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短

時間で効率よく調べる、いわゆる HTS (high throughput screening) が可能となった (Fodor, S. P. A., Science, 251, page 767 (1991) および Schena, M., Science, 270, page 467 (1995))。

【0006】

しかし、DNAチップ利用技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に整列固定させるためのDNAチップの作製技術が必要とされる。

【0007】

DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接DNA断片を合成する方法(「オン・チップ法」という。)と、予め別に調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィー技術および固相合成技術とを組み合わせ、微小なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法(「マスキング技術」という。)が代表的である。

【0008】

予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法がある。

(1) 固定するDNA断片がcDNA(mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA)やPCR産物(cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片)の場合には、これらをDNAチップ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン(ポリリシン、ポリエチレンジイミン等)で表面処理した固相担体表面に点着して、DNAの荷電を利用して固相担体に静電結合させる方法が一般的に利用される。また、固相担体表面の処理方法として、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている(Geo, Z. et al., Nucleic Acid Research, 22, 5456-5465 (1994))。この場合には、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に導入されるため、ポリ陽イオンによる場合と比較して安定に固相担体表面に存在する。

【0009】

DNAの荷電を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC（標準食塩クエン酸緩衝液）に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行う方法が報告されている（Schen a, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614-10619 (1996)）。しかし、この固定方法では必ずしも十分な安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で安定にDNA断片を固定する技術の開発は、固定DNA断片と標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に大きく寄与する。

【0010】

(2) 固定するDNA断片が合成オリゴヌクレオチドの場合には、反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる（「蛋白質・核酸・酵素」、43巻、(1998)、2004-2011、Lamture, J. B. et al., Nucl. Acids Res., 22, 2121-2125, 1994、およびGuo. Z., et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465, 1994）。例えば、アミノ基を導入したスライドガラスに、PDC（p-フェニレンジイソチオシアネート）存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの二つの方法は、前記(1)のDNAの荷電を利用する方法と比べて、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に固定される。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法は、反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い（通常、加水分解が起こり易い）という問題点を有し、さらに、固相表面にアミノ基のようにDNAとの相互作用の強い官能基が全面に存在すると、被検体である核酸断片がDNAチップ全面に非特異的に付着しやすいため、検出を妨害するという問

題がある。このため、これを防止するために、未反応の官能基を塞ぐ、ブロッキングという工程が必要であった。

【 0 0 1 1 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、固相担体表面に、DNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法、ブロッキング工程を特に必要としないDNAチップ、および核酸断片の検出方法を提供することを、その課題とする。

【 0 0 1 2 】

【課題を解決するための手段】

上記の課題は下記の本発明によって解決された。

本発明は、表面に0価遷移金属薄膜が形成された固相担体の表面に、アルキン基を末端部に有するDNA断片を液相にて接触させ、該DNA断片をアルキン基末端部にて0価遷移金属薄膜に結合させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法にある。

本発明の固定方法において、0価遷移金属は、銀または銅であることが好ましい。

【 0 0 1 3 】

本発明は、また、上記記載の本発明の固定方法により得られたDNAチップにもある。

【 0 0 1 4 】

本発明は、さらに、上記記載の本発明のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にもある。

【 0 0 1 5 】

本発明は、さらにまた、上記記載の本発明のDNAチップの表面に、蛍光発生基もしくは導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料とを含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダーゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光もしくは導電性基を介して流れる電流を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【0016】

本発明についてさらに詳しく述べる。0価遷移金属が薄膜状に施された固相担体表面へのDNA断片固定は化学結合の形成をもって行われる。一般に遷移金属と末端アルキンが極めて速やかに化学結合を形成することは広く知られている。例えば、山本明夫著「有機金属化学」裳華房刊（1982年）、山崎博史、若槻康雄著「有機金属の化学」大日本図書（1989年）、山川浩司、松島美一、久留正雄著「有機金属錯体の化学」講談社刊（1989年）、Ch. Elschenbroich、A. Salzer著「オーガノメタリックス、ア・コンサイス・イントロダクション (Organometallics, A Concise Introduction)」VCH Publishers刊（1989年）、渡部正利、矢野重信、碓屋隆雄著「錯体化学の基礎」講談社（1990年）、伊藤卓、内本喜一郎、中村晃、千鯛眞信著「＜化学総説17＞前周期遷移金属の有機化学」山崎博史編、学会出版センター刊（1993年）、辻二郎著「遷移金属が拓く有機合成その多彩な反応形式と最新の成果」（株）化学同人刊（1997年）、L. Brandsma、S. F. Vasilovsky、H. D. Verkruijsse共著「アプリケーション・オブ・トランジション・メタル・キャタリスト・イン・オーガニック・シンセシス (Application of Transition Metal Catalysts in Organic Synthesis)」Springer刊（1998年）、Paul A. Grieco編「オーガニック・シンセシス・イン・ウォーター (Organic Synthesis in Water)」BLACKIE・ACADEMIC & PROFESSIONAL刊（1998年）などの成書に、種々の0価遷移金属と末端アルキンが速やかな化学結合を

形成することが記載されている。

【0017】

一方、本発明の目的である核酸断片の検出法においては、被検体試料の核酸断片には一般に0価遷移金属と強固な相互作用を有する基は存在しないため、0価遷移金属が固相担体表面に露出していても、ハイブリダイゼーションの際に被検体試料核酸断片は無差別には固相担体表面に結合せず、ハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。

【0018】

本発明はさらに以下のように具体化することができる。

本発明は、末端アルキンを結合したDNA断片を準備し、該末端アルキンを有するDNA断片を含む水性液を0価遷移金属を薄膜状に施した固相担体上に点着することにより固定が完了する。

【0019】

本発明のDNA断片の固相担体表面への固定方法の好ましい態様は、以下の通りである。

- (1) 0価遷移金属を薄膜状に施した固相担体を作製する。
- (2) DNA断片として、末端アルキンを結合したDNA断片で、その塩基配列が既知であるものを用いる。

【0020】

- (3) (1)で作成した固相担体表面に、(2)で作成したDNA断片を含有した水性液体を点着し、DNA断片を固相担体上に固定する。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明の代表的な固定方法について説明する。

ゼロ(0)価遷移金属を薄膜状に施された固相担体の表面に、DNA断片を含む水性液を点着し、DNA断片が固相担体表面と化学結合を形成する。このように、DNA断片を固定する工程を順次行い、必要によっては加熱処理を施すことによってDNAチップを得ることができる。

【0022】

0 価遷移金属が薄膜状に施された固相担体は、蒸着法によって作製することが好ましい。蒸着は、通常、金蒸着装置を用いて行うことができる。薄膜の厚さは、0.2 乃至 1000 nm の範囲にあることが好ましく、0.3 乃至 500 nm の範囲にあることがさらに好ましく、0.5 乃至 400 nm の範囲にあることが特に好ましい。また、0 価遷移金属が薄膜状に施された固相担体としては、0 価金属微粒子（直径は、10 乃至 500 nm の範囲にあることが好ましい）をポリビニルアルコール、ゼラチン等のバインダーに分散したものを固相担体上に塗布して作製したものも好ましく用いることができる。この場合には、公知の硬膜剤を用いて硬膜することが好ましい。

【0023】

本発明で用いる固相担体は、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノール A のポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織物、編み物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質、金などの導電性材料などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2 乃至 1000 nm の範囲にあることが好ましく、2 乃至 500 nm の範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100 乃至 2000 μ m の範囲にあることが好ましい。

【0024】

末端アルキンを有する DNA 断片を得る方法は大別して次の二つの方法が挙げられる。

一つは該官能基を有するプライマーを用いて PCR 法にて、該官能基を有する DNA 断片を増幅する方法であり、他の一つはアミノ基などの反応性基を有するプライマーを用いて PCR 法にて DNA 断片を増幅したのち、末端アルキンを有

する化合物を連結する方法である。

【0025】

通常は後者の方法が容易であり、本発明においても好ましい。末端にアミノ基が導入されたDNA断片の作成法については、公知であり、商業的に容易に入手可能である。従って、カップリング成分を固相担体に固定する方法と同様の方法が採用できる。すなわち、カルボキシル基、ホルミル基、ハロスルホニル基、イソシアナト基、イソチオシアナト基を有するカップリング成分や酸無水物、ケテンを部分構造として有するカップリング成分を、加熱や適当な塩基、縮合剤を用いてDNA断片のアミノ基と結合させることができる。この中ではカルボキシル基、ハロスルホニル基、イソシアナト基、イソチオシアナト基を有するものが好ましく、カルボキシル基を有するものは適当な縮合剤（カルボジイミド化合物など）を用いてアミド結合を形成する方法が好ましい。

【0026】

末端アルキンを有するDNA断片を固相担体に固定する工程中では、酸、塩基や触媒の使用、水および有機溶媒の使用、加熱なども適宜行うことができる。

酸としては無機酸および有機酸のいずれでも用いることができるが、塩酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、硫酸、p-トルエンスルホン酸などが好ましく、トリフルオロ酢酸、酢酸が好ましい。

【0027】

塩基としては、無機塩基および有機塩基の何れも用いることができるが、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミン、ピリジン、炭酸カリウムあるいは炭酸ナトリウムを用いることがより好ましく、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミンあるいはピリジンを用いることがさらに好ましく、1-メチル-2-ピロリドンを用いることが特に好ましい。

加熱する場合には、その温度は40乃至150℃の範囲にあることが好ましく、50乃至120℃の範囲にあることが特に好ましい。

【0028】

表面処理された固相担体表面上には、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによっ

て表面処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含有させることも可能であり、このような処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

【 0 0 2 9 】

末端アルキンを有するDNA断片は、当該官能基とリン酸エステル基との間に、合成の都合上、クロスリンカーを有していてもよい。クロスリンカーは、単結合、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノアルキレン基であることが好ましく、単結合、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノヘキシレン基であることが特に好ましい。

【 0 0 3 0 】

DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以下、「PCR産物」という。）。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、 4^n （ n は、塩基の長さ）種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【 0 0 3 1 】

DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポッター装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【 0 0 3 2 】

点着後のDNA断片の乾燥を防ぐために、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。ポリマーの分子量は 10^3 乃至 10^6 の範囲にあることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、DNA断片の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。

【0033】

また、同じ目的のために、DNA断片を点着した後の固相担体を、90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0034】

DNA断片を点着後、紫外線、水素化ホウ素ナトリウムあるいはシッフ試薬による後処理を施してもよい。これらの後処理は、複数の種類を組み合わせてもよく、加熱処理と紫外線処理を組み合わせることが特に好ましい。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0035】

DNA断片の固定量は、固相担体表面に対して、 10^2 乃至 10^5 種類/cm²の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、1乃至 10^{15} モルの範囲にあり、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。ドット間の距離は、0乃至1.5mmの範囲に

あることが好ましく、100乃至300 μm の範囲にあることが特に好ましい。
1つのドットの大きさは、直径が50乃至300 μm の範囲にあることが好ましい。
点着する量は、100 pL乃至1 μL の範囲にあることが好ましく、1乃至100 nLの範囲にあることが特に好ましい。

【0036】

表面に0価遷移金属薄膜が形成された固相担体の表面に、アルキン基を有するDNA断片を点着させると、該DNA断片が固相担体表面の一部に固定される。該DNA断片が固定されていない薄膜部分には、ハイブリダイゼーションの際に、標識された核酸断片試料が非特異的な反応によって固定される可能性があるため、予め、その薄膜部分をブロッキング処理（ブロッキング処理を施さなくても、本発明の固定方法によって製造された、DNA断片固定固相担体は、十分にDNAチップとして使用することができる。）しておくことも好ましい。ブロッキング処理に使用されるブロッキング試剤としては、水溶性の末端アルキン化合物、あるいは水溶性のメルカプト化合物を用いることが好ましく、具体例としては、プロパルギルアルコール、3-スルホフェニルアセチレン、チオグリコール酸、あるいはチオサリチル酸を挙げることができる。

【0037】

上記の工程によって作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されてなるcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションである。

【0038】

標識方法としては、大別してRI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、電気化学的方法、化学発光法等）とが知られているが、本発明のDNAチップは、蛍光法を用いる際に特に有利である。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、たとえば、シアニン色素（例えば、CyDyeTMシリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N²-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAF

のヨウ素誘導体)を使用することができる。

【0039】

なお、上記の標識を利用する以外にも、導電性基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いる電気化学的な検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップは電気化学的な検出方法に利用することもできる。あるいは、蛍光発生基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いて、ハイブリッドの形成を蛍光法により検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップはこの検出方法に利用することもできる。

【0040】

試料として用いる核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、末梢血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP(「dNTP」は、塩基がアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)もしくはチミン(T)であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。)を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数 μ g以下であることが好ましい。尚、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。

【0041】

試料核酸断片は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識dNTPを含む反応系で標的領域のPCRを行なって調製することが好ましい。

【0042】

ハイブリダイゼーション操作は、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーション操作は、室温乃至70℃の温度範囲で、そして6乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0043】

DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0044】

【実施例】

〔実施例1〕DNA断片固定スライドの作成及びDNA断片の固定量の測定

(1) 0価の遷移金属を薄膜状に施したスライド(C)の作成

スライドガラス(25mm×75mm)の上に金属銀(0価)を蒸着したものを作製し、スライド(C)とした。

【0045】

(2) DNA断片の点着と蛍光強度の測定

3'末端および5'末端がそれぞれアミノ基、蛍光標識試薬 (FluoroLink Cy5 dCTP、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) で修飾されたDNA断片 (3'CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATC5') を5-ヘキシノイックアシッド (東京化成工業 (株) 製) および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (いずれも東京化成工業 (株) 製) で処理し、3'末端に5-ヘプチノイルアミノ基が導入されたDNA断片を作成した。このDNA断片を0.1M炭酸緩衝液 (pH 9.3) に分散してなる水性液 (1×10^{-6} M、1 μ L) とし、上記 (1) で得たスライド (C) にこれを点着した。直ちに、それぞれの点着後のスライドを60℃、湿度90%にて1時間放置した後、このスライドを0.1重量% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) と2×SSC (2×SSC: SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC: 標準食塩クエン酸緩衝液) との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次洗浄した。次いで、上記の洗浄後のスライドを0.1Mプロパルギルアルコール水溶液 (pH 8.0) 中に1時間浸漬した後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させ、DNA断片が固定されたスライド (D1) を得た。このスライド (D1) 表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、それぞれ1552であった。本発明の固定化方法により、DNA断片が効率よくスライドガラスに固定されたことが分かる。

【0046】

[実施例2] 試料DNA断片の検出

(1) DNAチップの作成

末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定された (D2) を得た。

【0047】

(2) 試料DNA断片の検出

5'末端にCy5が結合した22merの試料オリゴヌクレオチド (GATCAGACACTTCACAGACTAG5') をハイブリダイゼーション用溶液 (4×SSCおよび10重量%のSDSの混合溶液) (20 μ L) に分散させたものを、上記 (1) で得たスライド (D2) に付与し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイス

チャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1重量% SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1重量% SDSと0.2×SSCとの混合溶液、および0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、600rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、598であった。

本発明の固定化方法によって作成されたDNAチップを用いることによって、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する試料DNA断片を検出できることが分かる。

【0048】

【発明の効果】

本発明によって、固相担体表面にDNA断片を安定かつ迅速に固定することができる。特に、固相担体表面に金属銀を蒸着した場合には、末端アルキンを結合したDNA断片を強固に固定することができる。DNA断片の安定な固定は、遺伝子解析等に有効に利用することができる高い検出限界を有するDNAチップの作製を可能になる。その一つの例として、本発明によって作製されたDNAチップを用いて、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを行うことにより、DNAチップに固定されているDNA断片に相補性を有する試料核酸断片を感度よく検出することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 固相担体表面に、DNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法を開発し、ブロッキング工程を特に要しないDNAチップを得ること。

【解決手段】 表面に0価遷移金属薄膜が形成された固相担体の表面に、アルキン基を末端部に有するDNA断片を液相にて接触させ、該DNA断片をアルキン基末端部にて0価遷移金属薄膜に結合させることを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法、この方法により得られたDNAチップ、そしてそのDNAチップを用いるDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片を検出する方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名 富士写真フイルム株式会社